

ДМИТРУК О.В.¹✉, БУЛБОТКА Н.В.¹, СИБІРНИЙ А.А.^{1,2}¹ Відділ молекулярної генетики і біотехнології, Інститут біології клітини НАН, України, 79005, м. Львів, вул. Драгоманова, 14/16, e-mail: verbaolena@gmail.com² Department of Biotechnology and Microbiology, University of Rzeszow, Poland, 35-60, Rzeszow, Cwiklinskiej, 2

✉ verbaolena@gmail.com, (099) 444-48-02

ВИВЧЕННЯ МЕХАНІЗМІВ ДЕГРАДАЦІЇ ФРУКТОЗО-1,6-БІСФОСФАТАЗИ У МЕТИЛОТРОФНИХ ДРІЖДЖІВ *PICCHIA PASTORIS*

Мета. Дослідити шляхи деградації фруктозо-1,6-бісфосфатази у метилотрофних дріжджів *Pichia pastoris*. **Методи.** Використовувалися методи визначення питомої активності фруктозо-1,6-бісфосфатази у дикого і мутантних штамів метилотрофних дріжджів *P. pastoris* за перенесення клітин із середовища з метанолом на середовище з глюкозою. Дослідження вмісту білка фруктозо-1,6-бісфосфатази проводили за допомогою Вестерн-блот аналізу. **Результати.** Досліджено зміни в активності фруктозо-1,6-бісфосфатази у контрольного штаму дикого типу GS200, штаму з делецією гена сенсора гексоз *GSS1* та штаму з дефектом автофагії SMD1163 *P. pastoris* за короткотривалої та довготривалої індукції метанолом із додаванням або ж без додавання інгібітора протеосомної деградації MG132. Досліджено деградацію фруктозо-1,6-бісфосфатази методом Вестерн-блот аналізу у штамів GS200, SMD1163 та *Δgss1*. **Висновки.** Показано, що тривалість інкубації клітин на метанолі не має особливого впливу на інактивацію ферменту. Ефект протеосомного інгібітора MG132 був незначний. Катаболітна інактивація цитозольних і пероксисомних ферментів пошкоджена в *Δgss1* мутанта, оскільки пошкоджене сигналювання глюкозою. Фруктозо-1,6-бісфосфатаза деградує вакуолярним шляхом, незалежно від тривалості індукції метанолом, що корелює з даними з активності цього ферменту.

Ключові слова: фруктозо-1,6-бісфосфатаза, дріжджі, *Pichia pastoris*, метанол, автофагія.

Метилотрофні дріжджі вважаються одними з найефективніших продуцентів власних та рекомбінантних білків промислового значення, зокрема інсуліну, поверхневого антигену вірусу гепатиту В, інтерферонів, ферментів алкогольоксидази, нітрилази тощо [1–3]. Запорукою створення штамів надпродуцентів білків промисло-

вого значення є не лише отримання штамів із високим рівнем синтезу цільового білка, але й максимальне зниження рівня деградації цього рекомбінантного білка у цитозолі. Деградація цитозольних білків, що ініціюється глюкозою, може відбуватися шляхом протеосомної деградації та/або автофагії. Встановлено, що ферменти з пероксисомною локалізацією деградують шляхом пексофагії (селективної деградації пероксисом) [4, 5]. Натомість механізми деградації власних цитозольних білків, а також рекомбінантних чужорідних білків біотехнологічного значення з цитозольною локалізацією у метилотрофних дріжджів залишаються не з'ясованими. За перенесення дріжджів із середовища з метанолом у середовище, що містить глюкозу, утворення більшості ферментів, задіяних в утилізації метанолу, репресується на транскрипційному рівні, а вже наявні у клітині ферменти піддаються швидкій деградації та протеолізу, а вуглецевий метаболізм клітини переходить на гліколітичний шлях. Цей процес називають катаболітною деградацією.

Ідентифіковано два основних взаєморегульованих шляхи білкової деградації в еукаріотичних клітинах: протеосомна деградація і деградація шляхом автофагії [6]. Автофагія – це процес, задіяний у деградації білків і органел, притаманний для всіх еукаріот [7, 8]. Дисфункція автофагії пов'язана із раком, нейродегенерацією, мікробною інфекцією і старінням. Тож дослідження різних аспектів автофагії на модельному об'єкті метилотрофних дріжджів та екстраполяція отриманих даних на інші еукаріотичні організми може мати важливе значення для медицини. На сьогодні ідентифіковано 42 гени, продукти яких беруть участь в автофагійних шляхах (ATG гени), а також багато інших генів, задіяних, крім автофагії, в інших споріднених процесах. Відносна сталість білкового складу клітини забезпечується наявністю балан-

су між процесами білкового синтезу і деградації. Протеосомна деградація білків у клітині відбувається в протеосомах – великих мультикаталітичних протеазних комплексах [9]. Шляхом селективного мічення (убіквітинування) і деградації білків протеосома впливає на клітинний цикл, апоптоз, проліферацію та інші клітинні процеси, регулюючи рівень важливих сигнальних білків.

Для дослідження можливих шляхів деградації цитозольних ферментів було обрано фруктозо-1,6-бісфосфатазу (Fbp1). У середовищі з глюкозою цей фермент швидко інактивується і деградує, тому є зручним модельним білком для досліджень. У дослідженнях на пекарських дріжджах *Saccharomyces cerevisiae* показано, що специфічна деградація Fbp1 та малатдегідрогенази відбувається за участю як протеосомної деградації, так і автофагії та ендоцитозу. До того ж у пекарських дріжджів шлях інактивації цього ферменту залежить від тривалості голодування за глюкозою; зокрема, за короткотривалого голодування відбувається протеосомна деградація ферменту, а за довготривалого – автофагія [10–13].

Матеріали і методи

У роботі використані хімічні сполуки, реактиви та ферменти виробництва фірм: «Sigma» (США), «Fluka» (Німеччина), «Fermentas» (Литва), «Difco» (США). Кваліфікація хімічних реактивів вітчизняного виробництва – «хч» та «осч».

Штами дріжджів *P. pastoris* вирощували у багатому середовищі YPD (1 % дріжджовий екстракт, 2 % пептон, 1 % глюкоза) або мінеральному середовищі YNB (0,67 % Yeast Nitrogen Base (Difco)) з додаванням різних джерел вуглецю. Як джерела вуглецю використовували метанол (0,5 % v/v), етанол (0,5 % v/v), глюкозу (2 % w/v). Для вирощування ауксотрофних штамів на мінеральних середовищах додавали відповідні фактори росту – амінокислоти L-гістидин – 50 мг/л, L-аргінін – 50 мг/л. Агаризовані середовища містили агар (2 % w/v). Вирощування дріжджів *P. paastoris* проводили на агаризованих середовищах на чашках Петрі у термостаті або культивували в рідких середовищах із перемішуванням 220 об./хв. за 28°C. Біомасу клітин (в одиницях оптичної густини (OD₆₀₀)) визначали за оптичним поглинанням розведених суспензій шляхом фотометрування на спектрофотометрі «Helios Epsilon» за довжи-

ни хвилі 600 нм у кюветі шириною 1 см.

Для приготування безклітинних екстрактів використовували скляні кульки. На першому етапі до осаду відмитих від культуральної рідини клітин додавали 50 мМ Тріс-НСІ буфер, рН 7,5 з 1 мМ PMSF (фенілметансульфонілфлуорид) до кінцевої концентрації клітин 50–100 мг/мл. Одержану суспензію переносили у пластикові пробірки «Епендорф» та додавали скляні кульки (діаметр 0,45–0,5 мм) в кількості 3/4 від об'єму суспензії і заморожували. Клітини руйнували методом вортексування (вібрації) протягом 15 хв. за +4°C з охолодженням на льоді через кожні 5 хв. Для отримання безклітинного екстракту гомогенізацію центрифугували протягом 20 хв. за 14000 об./хв. за +4°C на мікроцентрифугі. Супернатант використовували для подальшого аналізу.

Концентрацію білка визначали за методом Лоурі із співавторами [14], використовуючи бичачий сироватковий альбумін як стандарт.

Для визначення питомої активності фруктозо-1,6-бісфосфатази клітини підрощували до середини логарифмічної фази і готували безклітинні екстракти. Концентрацію білка визначали за методом Лоурі [14]. Активність Fbp1 визначали в реакційній суміші такого складу (на 1 мл): 1 М Тріс-НСІ буфер, рН 8,5 – 100 мкл; 0,5 М MgCl₂ – 10 мкл; 0,5 М EDTA – 2 мкл; 10 мМ NADP – 40 мкл; глюкозо-6-фосфатізомераза 5 мкл; глюкозо-6-фосфат-дегідрогеназа – 5 мкл; 100 мМ фруктозо-1,6-бісфосфат 20 мкл. Для запуску реакції до суміші додавали безклітинний екстракт у концентрації 0,1 мг/мл і визначали зміну екстинції за довжини хвилі 340 нм в кінетиці. Ця довжина хвилі відповідає піку поглинання нікотинамідних кофакторів.

Вестерн-блот аналіз проводився за раніше описаною методикою [15] з антитілами, специфічними до Fbp1 та алкогольоксидази (АОХ). Зразки для аналізу готували з використанням 12,5 % трихлороцтової кислоти і кип'ятіння з β-меркаптоетанолом. Концентрацію білка визначали за методом Лоурі із співавторами, використовуючи бичачий сироватковий альбумін як стандарт [14].

Результати та обговорення

Для створення надпродуцентів білків промислового значення важливо максимально знизити рівень деградації рекомбінантного білка у цитозолі. Нами було проведено дослідження механізмів деградації цитозольного білка Fbp1 у

штаму дикого типу GS200 *P. pastoris*, штаму з дефектом вакуолярних протеїназ SMD1163 та гена, що кодує сенсор глюкози ($\Delta gss1$). Fbp1 є зручним модельним білком для дослідження деградації цитозольних білків у метилотрофних дріжджів, оскільки він задіяний в утилізації метанолу і його активність суттєво і швидко спадає після перенесення метилотрофно вирощених клітин у середовище з глюкозою. Також досліджували деградацію Fbp1 в присутності інгібітора протеосомної деградації білків MG132. Досліджено зміни в активності Fbp1 та її деградацію методом імуноблотингу у названих штамів *P. pastoris* в умовах короткотривалого (1 доба) (рис. 1, 3) та довготривалого (3 доби) (рис. 2) голодування за глюкозою з додаванням або ж без додавання інгібітора протеосомної деградації MG132. Питома активність Fbp1 у штамів SMD1163 та $\Delta gss1$ зростала в 2–6 разів у

порівнянні з активністю Fbp1 штаму дикого типу, що свідчить про вакуолярний шлях деградації цього ферменту. Подібний ефект спостерігався для модельного пероксисомного ферменту АОХ (рис. 1, 2), для якого встановлений вакуолярний шлях деградації [16]. Виявлено, що інактивація ферменту Fbp1 та його деградація не залежать від тривалості голодування за глюкозою. Ефект протеосомного інгібітора MG132 був незначний.

Відповідно до результатів дослідження деградації Fbp1, отриманих методом Вестерн-блот аналізу (рис. 3) у штамів GS200, SMD1163 та $\Delta gss1$, можна зробити висновок, що, незалежно від тривалості голодування за глюкозою, Fbp1 деградує вакуолярним шляхом. Додавання протеосомного інгібітора MG132 не впливало на деградацію як Fbp1, так і АОХ у досліджуваних штамів (рис. 3), що підтверджує висновок.

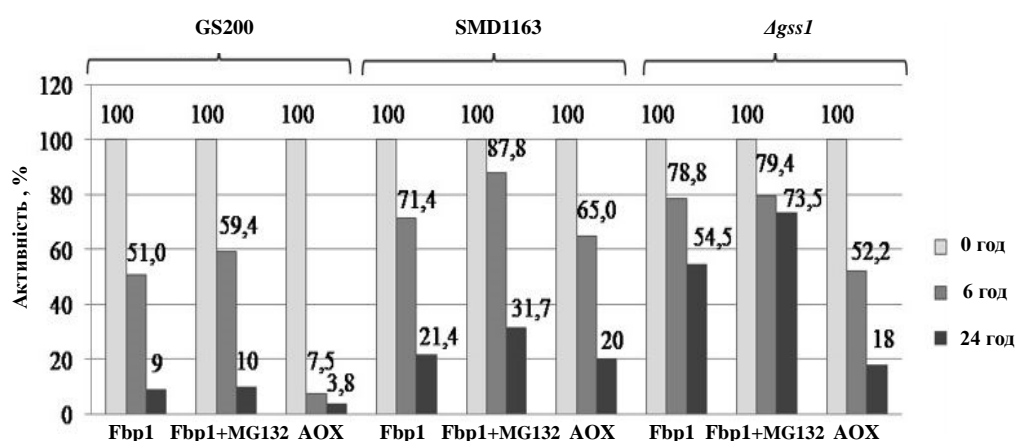


Рис. 1. Питомі активності Fbp1 та АОХ за умов короткотривалої (1 день) індукції метанолом у штамів GS200, SMD1163, $\Delta gss1$ метилотрофних дріжджів *P. pastoris*.

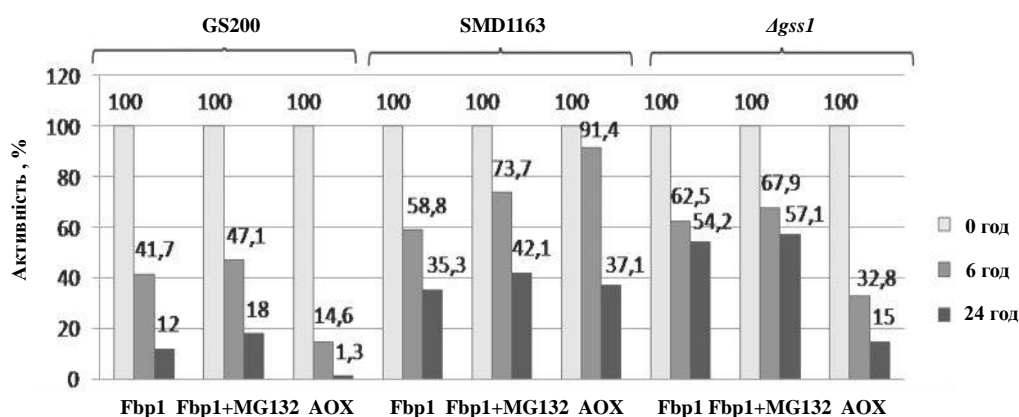


Рис. 2. Питомі активності Fbp1 та АОХ за умов довготривалої індукції метанолом (3 дні) у штамів GS200, SMD1163, $\Delta gss1$ метилотрофних дріжджів *P. pastoris*.

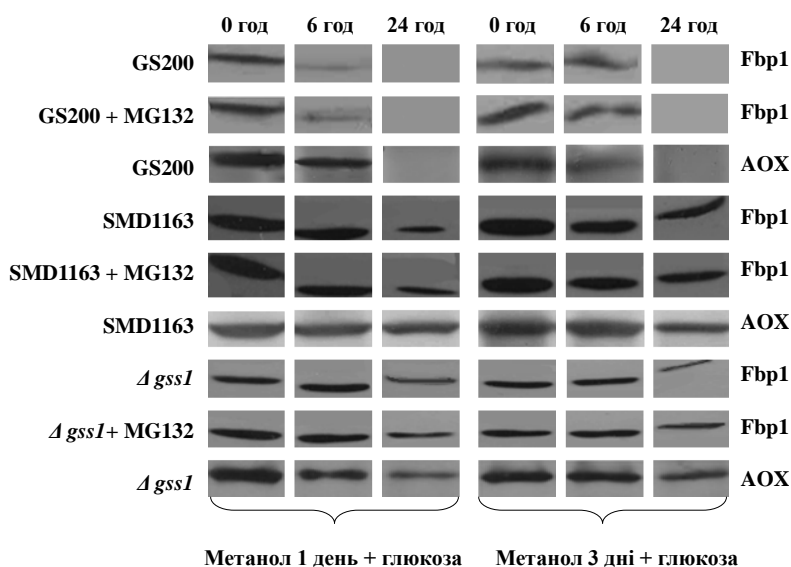


Рис. 3. Дослідження методом Вестерн-блот аналізу деградації цитозольного ферменту Fbp1 порівняно з пероксисомним ферментом AOX за умов короткотривалої та довготривалої інкубації клітин на метанолі у штаммах GS200, SMD1163, $\Delta gss1$.

Інактивація Fbp1 у штаму $\Delta gss1$ дещо сповільнена (порівняно із штамом дикого типу), що зумовлено зниженням вмісту внутрішньоклітинної глюкози, необхідної для катаболітної інактивації цього ферменту.

Висновки

Досліджено зміни в активності Fbp1 та деградацію цього ферменту у штаму дикого типу GS200, штамів із дефектом автофагії SMD1163 та делецією гена сенсора гексоз $GSS1$ *P. pastoris* за короткотривалої та довготривалої

індукції метанолом із додаванням або ж без додавання інгібітора протеосомної деградації MG132. Встановлено, що Fbp1 деградує вакуолярним шляхом незалежно від тривалості індукції метанолом, що корелює з даними про зміни в питомій активності цього ферменту.

Робота виконана в рамках цільової комплексної міждисциплінарної програми наукових досліджень НАН України «Молекулярні та клітинні біотехнології для потреб медицини, промисловості та сільського господарства», проект № 31–18.

Література

- Gellissen G. *Hansenula polymorpha*: Biology and Applications. Edited by G. Gellissen. 2002. WILEY.
- Krasovska O.S., Stasyk O.G., Nahorny V.O., Stasyk O.V., Granovski N., Kordium V.A., Vozianov O.F., Sibirny A.A. Glucose-induced production of recombinant proteins in *Hansenula polymorpha* mutants deficient in catabolite repression. 2007. *Biotechnol. Bioeng.* Vol. 97. P. 858–870. doi: 10.1002/bit.21284.
- Grabek-Lejko D., Sibirny V., Sibirny A. Regulation of gene expression in methylotrophic yeasts. *Postepy biochemii.* 2013. Vol. 59. P. 95–106.
- Farré J., Vidal C., Subramani S. A cytoplasm to vacuole targeting pathway in *P. pastoris*. *Autophagy.* 2007. Vol. 3. P. 230–234. doi: 10.4161/auto.3905.
- Farré J.C., Subramani S. Peroxisome turnover by micropexophagy: an autophagy-related process. *Trends Cell Biol.* 2004. Vol. 14. P. 515–523. doi: 10.1016/j.tcb.2004.07.014.
- Kirkin V., McEwan D.G., Novak I., Dikic I. A role for ubiquitin in selective autophagy. *Mol. Cell.* 2009. Vol. 34. P. 259–269. doi: 10.1016/j.molcel.2009.04.026.
- Sibirny A.A. Mechanisms of autophagy and pexophagy in yeasts. *Biochemistry (Mosc).* 2011. Vol. 76. P. 1279–1290. doi: 10.1134/S0006297911120017.
- Sibirny A.A. Yeast peroxisomes: structure, functions and biotechnological opportunities. *FEMS Yeast Research.* 2016. Vol. 16, N. 4. doi: 10.1093/femsyr/fow038.
- Naujokat C., Hoffman S. Role and function of the 26S proteasome in proliferation and apoptosis. *Lab. Invest.* 2002. Vol. 82. P. 965–980.
- Hung G.C., Brown C.R., Wolfe A.B., Liuand J., Chiang H.L. Degradation of the gluconeogenic enzymes fructose-1,6-bisphosphatase and malate dehydrogenase is mediated by distinct proteolytic pathways and signaling events. *J. Biol. Chem.* 2004. Vol. 279. P. 49138–49150. doi: 10.1074/jbc.M404544200.

11. Brown C.R., Wolfe A.B., Chiang H.L. The vacuolar import and degradation pathway merges with the endocytic pathway to deliver fructose-1,6-bisphosphatase to the vacuole for degradation. *J. Biol. Chem.* 2008. Vol. 283. P. 26116–26127. doi: 10.1074/jbc.M709922200.
12. Menssen R., Schweiggert J., Schreiner J., Kusevic D., Reuther J., Braun B., Wolf D.H. Exploring the topology of the Gid complex, the E3 ubiquitin ligase involved in catabolite-induced degradation of gluconeogenic enzymes. *J. Biol. Chem.* 2012. Vol. 287. P. 25602–25614. doi: 10.1074/jbc.M112.363762.
13. Giardina B.J., Chiang H.L. Fructose-1,6-bisphosphatase, malate dehydrogenase, isocitrate lyase, phosphoenolpyruvate carboxykinase, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, and cyclophilin A are secreted in *Saccharomyces cerevisiae* grown in low glucose. *Commun. Integr. Biol.* 2013. Vol. 6. P. 27216. doi: 10.4161/cib.27216.
14. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randal R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951. Vol. 193. P. 265–275.
15. Baerends R.J., Faber K.N., Kram A.M., Kiel J.A., van der Klei I.J., Veenhuis M. A stretch of positively charged amino acids at the N terminus of *Hansenula polymorpha* Pex3p is involved in incorporation of the protein into the peroxisomal membrane. *J. Biol. Chem.* 2000. Vol. 275, № 14. P. 9986–9995.
16. Tuttle D.L., Dunn A.J. Divergent modes of autophagy in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *J. Cell. Sci.* 1995. Vol. 108. P. 25–35.

DMYTRUK O.V.¹, BULBOTKA N.V.¹, SIBIRNY A.A.^{1,2}

¹ Department of Molecular Genetics and Biotechnology, Institute of Cell Biology, NAS of Ukraine, Ukraine, 79005, Lviv, Drahomanov str., 14/16

² University of Rzeszow, Department of Biotechnology and Microbiology, Poland, 35-60, Rzeszow, Cwiklinskiej, 2

THE MECHANISMS OF FRUCTOSE-1,6-BISPHOSPHATASE DEGRADATION IN METHYLOTROPHIC YEASTS *PICHIA PASTORIS*

Aim. The study of the mechanisms of fructose-1,6-bisphosphatase degradation in methylotrophic yeasts *Pichia pastoris*.

Methods. Methods of determination the specific activity of fructose-1,6-bisphosphatase in the wild type and mutant strains of methylotrophic yeast *P. pastoris* after shifting cells from the medium with methanol into the medium with glucose were used. The study of fructose-1,6-bisphosphatase protein degradation was performed by Western blot analysis. **Results.** The changes of the specific activity of fructose-1,6-bisphosphatase in the wild type strain GS200, the strain with the deletion of the *GSS1* hexose sensor gene and strain defected in autophagy pathway SMD1163 of *P. pastoris* in short-term and long-term induction with methanol, and with or without the addition of the MG132 (proteasome degradation inhibitor) was investigated. Degradation of fructose-1,6-bisphosphatase by the Western blot analysis in GS200, SMD1163 and *Δgss1* strains was studied. **Conclusions.** It was shown that the duration of cell incubation on methanol has no particular effect on the inactivation of the enzyme. The effect of the proteasome inhibitor MG132 was insignificant. Catabolic inactivation of cytosolic and peroxisomal enzymes is damaged in the *Δgss1* mutant as glucose signaling is impaired. Fructose-1,6-bisphosphatase degrades by a vacuolar pathway, regardless of the duration of methanol induction, which correlates with the activity data of this enzyme.

Keywords: fructose-1,6-bisphosphatase, yeasts, *Pichia pastoris*, methanol, autophagy.